



B1

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 42 09 022 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 42 09 022.9  
㉔ Anmeldetag: 20. 3. 92  
㉕ Offenlegungstag: 21. 10. 93

㉓ Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 12 N 9/04**  
C 12 P 7/02  
C 07 C 29/143  
// (C12N 9/04, C12R  
1:72,1:01)

DE 42 09 022 A 1

㉑ Anmelder:  
Bayer AG, 51373 Leverkusen, DE

㉒ Erfinder:  
Hummel, Werner, Dr., 5177 Titz, DE; Gottwald,  
Christiane, Dipl.-Ing., 4100 Duisburg, DE

Der Inhalt dieser Schrift weicht von den am Anmeldetag eingereichten Unterlagen ab

㉔ Verfahren zur enzymatischen Herstellung von sekundären (S)-Alkoholen

㉕ Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues enzymatisches Verfahren zur Herstellung von sekundären (S)-Alkoholen aus Ketonen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man unsymmetrische Ketone mit Dehydrogenasen mikrobieller Herkunft, welche gegebenenfalls immobilisiert vorliegen, zusammen mit dem Coenzym NADH behandelt und die (S)-Alkohole nach üblichen Methoden isoliert.

DE 42 09 022 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues enzymatisches Verfahren zur Herstellung von sekundären (S)-Alkoholen aus Ketonen mit Dehydrogenasen mikrobieller Herkunft sowie die für die Durchführung des Verfahrens geeigneten Enzyme.

Optisch aktive Alkohole sind wertvolle chirale Bausteine, die in der Synthese von biologisch aktiven Stoffen verwendet werden können. Bisher sind keine Verfahren bekannt, nach denen sekundäre (S)-Alkohole in hoher Reinheit und guter Ausbeute auf relativ einfache Weise hergestellt werden können.

Es wurde nun gefunden, daß man sekundäre (S)-Alkohole erhält, wenn man unsymmetrische Ketone mit Dehydrogenasen mikrobieller Herkunft, welche gegebenenfalls immobilisiert vorliegen, zusammen mit dem Coenzym NADH behandelt und die (S)-Alkohole nach üblichen Methoden isoliert.

Weiterhin wurden neue Dehydrogenasen aus mikrobieller Herkunft gefunden, die für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt werden können.

Die erfindungsgemäß geeigneten Dehydrogenasen bzw. Mikroorganismen, die geeignete Dehydrogenasen enthalten, können dadurch erhalten werden, daß man Mikroorganismen unter den üblichen Bedingungen kultiviert, die sekundären Ketone (beispielsweise und vorzugsweise Acetophenon oder p-Chloracetophenon) mit dem Fermentationsgut, gegebenenfalls nach Aufschluß der Mikroorganismen-Zellen, zusammen mit dem Coenzym NADH behandelt, auf die Bildung von (S)-Alkoholen prüft und die Mikroorganismen-Stämme (oder Stammgemische) mit ausreichender Dehydrogenaseaktivität ausliest. Auf diese Weise können in einfachen Routineuntersuchungen geeignete Mikroorganismen mit geeigneten Enzymen leicht erkannt werden (vgl. Screening-Verfahren, unten).

Bei der Auswahl geeigneter Dehydrogenasen bildender Mikroorganismen kommen praktisch alle Typen von Mikroorganismen infrage, wobei es ohne Belang ist, ob es sich dabei um prokaryotische oder eukaryotische Mikroorganismen handelt, sofern diese nur in der Lage sind, die geeigneten Dehydrogenasen zu erzeugen, welche mit dem Coenzym NADH unsymmetrische Ketone in sekundäre (S)-Alkohole umwandeln können.

Bevorzugt werden Pilze der Gattungen *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Phoma*, *Stemphylium* sowie andere Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota oder Deuteromycota oder aber Bakterien der Gattungen *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* oder *Streptomyces*.

Besonders bevorzugt werden Mikroorganismen der Art *Candida succiphilia* und *Pseudonocardia thermophila* und ganz besonders bevorzugt Mikroorganismen der Art *Rhodococcus erythropolis*. Besonders hervorgehoben werden sollen die beiden folgenden Stämme von *Rhodococcus erythropolis*, welche bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D 3300 Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland in Übereinstimmung mit den Bestimmungen des Budapestervertrages über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren hinterlegt wurden (Hinterlegungsdatum: 28.02.1992):

Stamm	Hinterlegungsbezeichnung
-------	--------------------------

<i>Rhodococcus erythropolis</i> 743	DSM 6971
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 43297	DSM 6977

Weiterhin seien speziell der *Candida succiphilia* Stamm DSM 2149 und der *Pseudonocardia thermophila* Stamm DSM 43027 als geeignete Mikroorganismen Stämme aufgeführt.

Die erfindungsgemäß verwendbaren neuen Enzyme sind Bestandteil der vorliegenden Erfindung. Sie sind dadurch gekennzeichnet, daß sie

- Dehydrogenasen sind,
- mikrobieller Herkunft sind und
- spezifisch in Gegenwart von NADH (nicht von NADPH) als Coenzym unsymmetrische Ketone zu sekundären (S)-Alkoholen reduzieren können.

Bevorzugte erfindungsgemäße Enzyme (Dehydrogenasen) sind solche, die aus den Mikroorganismen Arten *Candida succiphilia*, *Rhodococcus erythropolis* und *Pseudonocardia thermophila* erhältlich sind.

Ganz besonders bevorzugte erfindungsgemäße Enzyme sind die Enzyme, welche aus den Mikroorganismen der Art *Rhodococcus erythropolis*, insbesondere den Stämmen *Rhodococcus erythropolis* 743, entsprechend DSM 6971 und *Rhodococcus erythropolis* 43297 entsprechend DSM 6977 erhältlich sind.

Besonders hervorgehoben werden soll als erfindungsgemäßes Enzym das Enzym, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es

- eine Dehydrogenase ist,
- aus *Rhodococcus erythropolis* (vorzugsweise *Rhodococcus erythropolis* 743 und 43297, entsprechend DSM 6971 und DSM 6977) erhältlich ist
- in Gegenwart von NADH als Coenzym spezifisch unsymmetrische Ketone zu sekundären (S)-Alkoholen reduzieren kann und
- ein Molekulargewicht von  $72\,000 \pm 5000$  Dalton aufweist.

Zusätzlich zur obigen Charakterisierung der erfindungsgemäßen Enzyme können zu deren weiteren Charakterisierung auch die weiter unten aufgeführten Herstellungsparameter und/oder die für die Reduktion der Ketone zu verwendenden Reaktionsparameter herangezogen werden.

Wie bereits erwähnt wurde, können die erfindungsgemäßen Enzyme in isolierter Form, gegebenenfalls in Form der üblichen Enzympräparationen, wie an Träger gebunden oder verkapselt oder noch in den (vorzugsweise abgetöteten) Mikroorganismus-Zellen vorliegen, wobei die Mikroorganismus-Zellen ihrerseits immobilisiert, also z. B. an Träger gebunden und/oder verkapselt, vorliegen können.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens können die benötigten Dehydrogenasen nach den allgemein üblichen Methoden erhalten werden. Die Mikroorganismen werden in bekannter Weise durch Fermentation gewonnen und die Enzyme, falls dies gewünscht wird, nach den üblichen Verfahren isoliert. Die Mikroorganismen und Enzyme können nach bekannten Methoden in geeignete Mikroorganismus-Zubereitungen oder Enzym-Präparatoren (also z. B. Produkte mit trägergebundenen oder eingekapselten Enzymen oder mit immobilisierten Mikroorganismen) überführt werden.

Die Fermentationsverfahren zur Herstellung der Mikroorganismen bzw. Enzyme können in üblicher Weise mit Hilfe fester, halbfester oder flüssiger Nährmedien durchgeführt werden. Bevorzugt werden wäßrig-flüssige Nährmedien verwendet.

Die Beimpfung der Nährmedien erfolgt nach allgemein üblichen Methoden, z. B. über Sporensuspensionen, Schrägröhrchen oder Kolbenkulturen.

Die Kultur erfolgt je nach Mikroorganismus, unter aeroben oder anaeroben Bedingungen und kann gemäß den allgemein üblichen Methoden wie unter Verwendung von Schüttelkulturen z. B. in Schüttelkolben, von luftbewegten Kulturen oder von Submerskulturen durchgeführt werden. Bevorzugt erfolgt die Kultivierung im aeroben Submersverfahren in belüfteten Fermentern, z. B. in üblichen gerührten Submersfermentern. Es ist möglich, die Kultur kontinuierlich oder diskontinuierlich durchzuführen. Vorzugsweise wird diskontinuierlich gearbeitet.

Die Kultur kann in allen Nährmedien durchgeführt werden, welche bekannterweise zur Kultivierung von Mikroorganismen verwendet werden. Das Nährmedium muß eine oder mehrere assimilierbare Kohlenstoffquellen und Stickstoffquellen sowie Mineralsalze enthalten, wobei diese Produkte in Form von definierten Einzelbestandteilen, aber auch in Form von komplexen Gemischen, wie sie insbesondere biologische Produkte verschiedenen Ursprungs darstellen, vorliegen können.

Als Kohlenstoffquellen kommen alle üblichen Kohlenstoffquellen in Frage. Beispielsweise seien Kohlenhydrate, insbesondere Polysaccharide, wie Stärke oder Dextrine, Disaccharide, wie Maltose oder Rohrzucker, Monosaccharide, wie Glucose oder Xylose, Zuckeralkohole, wie Mannit oder Glycerin sowie natürlich vorkommende Gemische, wie Malzextrakt, Melasse oder Molkepulver genannt. Auch Kohlenwasserstoffe können dem Nährmedium zugefügt werden. Als Stickstoffquellen kommen alle üblichen organischen und anorganischen Stickstoffquellen in Frage. Beispielsweise seien Eiweißstoffe, Eiweißhydrolysate, Aminosäuren, wie Glutaminsäure, Asparaginsäure, Fleischmehl, Fleischhydrolysate sowie Sojabohnenmehl, Baumwollsaamenmehl, Linsenmehl, Erbsenmehl, lösliche und unlösliche pflanzliche Proteine, Maisquellwasser, Hefeextrakt, Peptone und Fleischextrakt sowie Ammoniumsalze und Nitrate, z. B.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{O}_4$ , Harnstoff,  $\text{NaNO}_3$  und  $\text{KNO}_3$  aufgeführt. Die Mineralsalze, welche im Nährmedium enthalten sein sollten, liefern z. B. folgende Ionen:

$\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{--}$ ,  $\text{PO}_4^{---}$  und  $\text{NO}_3^-$

sowie Ionen der üblichen Spurenelemente, wie Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Co, Ni. Falls die Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen bzw. das verwendete Wasser nicht ausreichend diese Salze bzw. Spurenelemente enthalten, ist es zweckmäßig, das Nährmedium entsprechend zu ergänzen. Die Zusammensetzung der Nährmedien kann in weiten Bereichen variiert werden. Art und Zusammensetzung der Nährmedien werden im allgemeinen davon abhängig sein, welche Bestandteile jeweils besonders günstig zur Verfügung stehen. Im allgemeinen enthalten die Nährlösungen vorzugsweise etwa 0,5 bis 8%, insbesondere 0,6 bis 6% Kohlenstoffquellen, vorzugsweise etwa 0,5 bis 4%, insbesondere 0,5 bis 3% Stickstoffquellen und vorzugsweise etwa 0,001 bis 0,5%, insbesondere 0,003 bis 0,3% Mineralsalze.

Über die zum Wachstum der Mikroorganismen nötigen Bestandteile der Nährlösungen können weitere Zusätze zu den Medien gemacht werden, die zu einer Erhöhung der Rate der Enzymbildung durch die Mikroorganismen oder zu einer Erhöhung der volumetrischen Gesamtausbeute an Enzym führen können. Auch können solche Substanzen zu einer Verbesserung der Gewinnung des Enzyms führen oder dessen Freisetzung erleichtern, oder aber zur Stabilisierung der Zellen dienen, wenn ganze Zellen in freiem oder immobilisiertem Zustand für die Umsetzung eingesetzt werden.

Bei den genannten Nährmedienzusätzen kann es sich um Emulgatoren und oberflächenaktive Substanzen handeln, wie z. B. Tween 80, Brij 58, Benzylalkohol, Phenethylalkohol, Triton X 100 sowie aliphatische Alkohole verschiedener Kettenlänge und Kohlenwasserstoffe.

Der pH-Wert der wachsenden Kulturen sollte vorzugsweise zwischen etwa 5 und etwa 10, insbesondere zwischen 6,5 und 9,5 gehalten werden. Ein zu starker pH-Abfall in den sauren Bereich kann durch Zusätze einer organischen oder anorganischen Base, vorzugsweise von  $\text{CaCO}_3$  vermieden werden. Wie in der Fermentationstechnologie üblich, kann auch eine automatische pH-Regulierung durchgeführt werden, bei der sterile organische oder anorganische Säure, z. B.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , oder sterile Lauge, z. B.  $\text{NaOH}$  in Abständen in die Kulturlösung eingespritzt wird.

Es ist zweckmäßig sicherzustellen, daß die Mikroorganismen ausreichend mit Sauerstoff (bei aerobisch kultivierten Mikroorganismen) sowie den Nährstoffen in Kontakt gebracht werden. Dies kann nach den allgemein üblichen Methoden wie Schütteln und Rühren erfolgen.

Die Züchtungstemperatur kann zwischen etwa 15 und etwa 40°C, vorzugsweise zwischen 20 und 35°C liegen, besonders bevorzugt liegt sie bei etwa 26°C. Die Dauer der Züchtung kann stark variiert werden, wobei z. B. die Zusammensetzung des Nährmediums und die Züchtungstemperatur eine Rolle spielen. Die jeweiligen optimalen Bedingungen können von jedem Fachmann auf dem mikrobiologischen Gebiet leicht festgelegt werden.

Wie allgemein bei mikrobiologischen Verfahren sollten Fremdinfectionen der Kulturmedien vermieden werden. Hierzu werden die üblichen Vorkehrungen getroffen, wie Sterilisation der Nährmedien, der Kulturgefäße sowie der für die Belüftung notwendigen Luft. Zur Sterilisation der Vorrichtungen können z. B. Dampf- als auch die Trockensterilisation verwendet werden, wobei die Temperaturen vorzugsweise bei 100 bis 140°C, insbesondere bei 120 bis 130°C liegen können.

Falls bei der Kultivierung in unerwünschter Menge Schaum entsteht, können die üblichen chemischen Schaumdämpfungsmittel, z. B. flüssige Fette und Öle, Öl-Wasser-Emulsionen, Paraffine, höhere Alkohole, wie Octadecanol, Siliconöle, Polyoxyethylen- bzw. Polyoxypropylenverbindungen (z. B. in Mengen bis etwa 1%) zugesetzt werden. Schaum kann auch mit Hilfe der üblichen mechanischen Vorrichtungen (welche z. B. Zentrifugalkräfte benutzen) gedämpft oder beseitigt werden.

Das Verfahren der Aufarbeitung des Fermentationsgutes mit nachfolgender Abtrennung, wird zweckmäßigerweise wie folgt, durchgeführt, wobei sich unterschiedliche Verfahrensmaßnahmen ergeben, wenn die Enzyme zellfrei oder zellgebunden oder sowohl zellfrei als auch zellgebunden vorliegt.

Zur Gewinnung der Zubereitung einer extrazellulären Dehydrogenase wird nach Beendigung der Fermentation die Fermentationsbrühe nach den üblichen Methoden (z. B. durch Zentrifugation) von den Zellen abgetrennt. Aus der erhaltenen zellfreien Fermentationsbrühe wird das Enzym (neben anderen Eiweißbestandteilen) ebenfalls nach üblichen Methoden (z. B. Zugabe von Alkoholen, wie Methanol oder Ethanol oder von anorganischen Salzen, wie Ammoniumsulfat) ausgefällt. Der Niederschlag wird (z. B. durch Zentrifugation) abgetrennt und in einer Pufferlösung (z. B. Phosphatpuffer) aufgelöst. Diese Lösung kann direkt für die Durchführung des Reduktionsschrittes verwendet werden. Im Falle, daß das Enzym zellgebunden vorliegt, können die abgetrennten Zellen auch in einer Pufferlösung aufgeschwemmt und direkt für die Reduktion eingesetzt werden. Normalerweise ist es nicht erforderlich eine weitere Reinigung dieser Enzymzubereitungen vorzunehmen. Eine weitere Aufarbeitung der Enzymzubereitungen kann jedoch nach den allgemein üblichen Methoden leicht erfolgen (z. B. Umfällungsmethoden, chromatographische Methoden, Freisetzung von zellgebundenem Enzym durch Zellertrümmerung usw.) und ist besonders dann wünschenswert, wenn das Enzym nach den üblichen Methoden in modifizierter Form, z. B. an feste anorganische oder organische Träger (z. B. Zeolithe, Polysaccharide, Polyamide, Polystyrolharze, Polyacrylharze usw.) gebunden oder mikroverkapselt eingesetzt werden soll (immobilisiertes Enzym).

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren werden vorzugsweise unsymmetrische sekundäre (S)-Alkohole der Formel (I)



in welcher  
R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> von einander verschiedene organische Reste bedeuten,  
durch die Reduktion der unsymmetrischen Ketone der Formel (II)



in welche  
R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> die oben angegebene Bedeutung haben,  
erhalten.

Als organische Reste R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> stehen bevorzugt aliphatische, araliphatische oder aromatische Reste, wobei die aliphatischen Reste auch cycloaliphatische Reste und die aromatischen Reste auch heteroaromatische Reste einschließen sollen.

Die aliphatischen und cycloaliphatischen Reste sowie die aliphatischen Teile der araliphatischen Reste können gesättigt oder ungesättigt sein und durch ein oder mehrere, gleiche oder verschiedene Heteroatome oder Heterogruppen, insbesondere durch Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff, unterbrochen sein. Cycloaliphatische Reste enthalten vorzugsweise 4 bis 7 Ringglieder.

Aromatische Reste sind mono- oder polycyclische aromatische Reste (vorzugsweise Phenyl oder Naphthyl).

Heteroaromatische Reste enthalten vorzugsweise 5 oder 6 Ringglieder und 1 bis 3 gleiche oder verschiedene Heteroatome oder Heterogruppen (vorzugsweise Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff).

Ungesättigte aliphatische oder cycloaliphatische Reste sowie aliphatische Teile von aliphatischen Resten enthalten eine oder mehrere, vorzugsweise 1 bis 3, Doppel- oder Dreifachbindungen.

Die aliphatischen, araliphatischen oder aromatischen Reste  $R^1$  und  $R^2$  können ihrerseits durch einen oder mehrere, vorzugsweise 1 bis 3, gleiche oder verschiedene weitere aliphatische, araliphatische oder aromatische Reste über eine C—C-Bindung oder über Heteroatome oder Heterogruppen, vorzugsweise Sauerstoff, Schwefel- oder Stickstoff, substituiert sein.

Die aliphatischen, araliphatischen oder aromatischen Reste (als  $R^1$  und  $R^2$  oder deren Substituenten) können durch die in der organischen Chemie üblichen Substituenten ein oder mehrfach, vorzugsweise 1 bis 3fach, gleich oder verschieden substituiert sein, wobei als Substituent beispielhaft die Halogene (vorzugsweise Fluor, Chlor, Brom und Iod) Cyano oder Nitro erwähnt seien.

Als aliphatische Reste stehen vorzugsweise gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Cycloalkyl-, Heterocycloalkyl-, Alkenyl- oder Alkynylreste.

Als aromatische Reste stehen vorzugsweise gegebenenfalls substituierte Phenyl- oder aromatische Heterocycl-Reste.

Gegebenenfalls substituiertes Alkyl bedeutet geradkettiges oder verzweigtes Alkyl mit vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielhaft und vorzugsweise seien gegebenenfalls substituiertes Methyl, Ethyl, n.- und i.-Propyl, n.-, i.-, s.- und t-Butyl, genannt.

Gegebenenfalls substituiertes Alkenyl bedeutet geradkettiges oder verzweigtes Alkenyl mit vorzugsweise 2 bis 6, insbesondere 2 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielhaft und vorzugsweise seien gegebenenfalls substituiertes Ethenyl, Propenyl-(1), Propenyl-(2) und Butenyl-(3) genannt.

Gegebenenfalls substituiertes Alkynyl bedeutet geradkettiges oder verzweigtes Alkynyl mit vorzugsweise 2 bis 6, insbesondere 2 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielhaft und vorzugsweise seien gegebenenfalls substituiertes Ethinyl, Propinyl-(1), Propinyl-(2) und Butinyl-(3) genannt.

Gegebenenfalls substituiertes Cycloalkyl bedeutet mono-, bi- und tricyclisches Cycloalkyl mit vorzugsweise 3 bis 10, insbesondere 3, 5 oder 6 Kohlenstoffatomen. Beispielsweise und vorzugsweise seien gegebenenfalls substituiertes Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl, Bicyclo (2.2.1) heptyl, Bicyclo (2.2.2) octyl und Adamantyl genannt.

Gegebenenfalls substituiertes Aryl bedeutet vorzugsweise gegebenenfalls substituiertes Phenyl oder Naphthyl, insbesondere Phenyl.

Als araliphatische Reste steht vorzugsweise gegebenenfalls substituiertes Aralkyl. Gegebenenfalls substituiertes Aralkyl bedeutet gegebenenfalls im Arylteil und/oder Alkylteil substituiertes Aralkyl mit vorzugsweise 6 oder 10, insbesondere 6 Kohlenstoffatomen im Arylteil (vorzugsweise Phenyl oder Naphthyl, insbesondere Phenyl) und vorzugsweise 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen im Alkylteil, wobei der Alkylteil geradkettig oder verzweigt sein kann. Beispielhaft und vorzugsweise seien gegebenenfalls substituiertes Benzyl und Phenylethyl genannt.

Gegebenenfalls substituierte Heterocycloalkylreste und aromatische Heterocycl-Reste bedeuten heteroparaffinische, heteroaromatische und heteroolefinische 5- bis 7-gliedrige Ringe mit vorzugsweise 1 bis 3, insbesondere 1 oder 2 gleichen oder verschiedenen Heteroatomen. Als Heteroatome stehen Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff. Beispielhaft und vorzugsweise seien gegebenenfalls substituiertes Pyrrolidinyl, Piperidinyl, Furyl, Thenyl, Pyrazolyl, Imidazolyl, 1,2,3- und 1,2,4-Triazolyl, Oxazolyl, Isoxazolyl, Tiazolyl, Isothiazolyl, 1,2,3-, 1,3,4-, 1,2,4- und 1,2,5-Oxadiazolyl, Azepinyl, Pyrrolyl, Isopyrrolyl, Pyridyl, Piperazinyl, Pyridazinyl, Pyrimidinyl, Pyrazinyl, 1,3,5-, 1,2,4- und 1,2,3-Triazinyl, 1,2,4-, 1,3,2-, 1,3,6- und 1,2,6-Oxazinyl, Oxepinyl, Thiopinyl und 1,2,4-Diazepinyl genannt.

Die aufgeführten gegebenenfalls substituierten Reste können einen oder mehrere, vorzugsweise 1 bis 3, insbesondere 1 oder 2 gleiche oder verschiedene Substituenten tragen. Als Substituenten seien beispielhaft und vorzugsweise genannt:

Alkyl mit vorzugsweise 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen, wie Methyl, Ethyl, n.- und i.-Propyl und n.-, i.- und t-Butyl; Alkoxy mit vorzugsweise 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen, wie Methoxy, Ethoxy, n.- und i.-Propyloxy und n.-, i.- und t-Butyloxy; Alkylthio mit vorzugsweise 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen, wie Methylthio, Ethylthio, n.- und i.-Propylthio und n.-, i.- und t-Butylthio; Halogenalkyl mit vorzugsweise 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen und vorzugsweise 1 bis 5, insbesondere 1 bis 3 Halogenatomen, wobei die Halogenatome gleich oder verschieden sind und als Halogenatome, vorzugsweise Fluor, Chlor oder Brom, insbesondere Fluor stehen, wie Trifluormethyl, Hydroxy; Halogen, vorzugsweise Fluor, Chlor, Brom und Iod, insbesondere Fluor, Chlor und Brom; Cyano; Nitro; Amino; Monoalkyl- und Dialkylamino mit vorzugsweise 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen je Alkylgruppe, wie Methylamino, Methyl-ethyl-amino, n.- und i.-Propylamino und Methyl-n.-Butylamino; Alkylsulfonyl mit vorzugsweise 1 bis 4, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatomen, wie Methylsulfonyl und Ethylsulfonyl; Arylsulfonyl mit vorzugsweise 6 oder 10 Arylkohlenstoffatomen, wie Phenylsulfonyl sowie seinerseits gegebenenfalls durch die hier aufgeführten Reste substituiertes Phenoxy.

Besonders bevorzugt stehen  $R^1$  und  $R^2$  für gegebenenfalls substituierte Reste aus der Reihe Alkyl, Phenyl und Phenylalkyl (vorzugsweise Benzyl).

Als besonders bevorzugte Substituenten seien aufgeführt: Halogen (Fluor, Chlor, Brom und Iod, vorzugsweise Fluor, Chlor und Brom),  $C_1$ — $C_4$ -Alkyl sowie  $C_1$ — $C_4$ -Halogenalkyl und  $C_1$ — $C_4$ -Halogenalkoxy (mit vorzugsweise jeweils 1 bis 3 Kohlenstoffatomen und vorzugsweise 1 bis 7, insbesondere 1 bis 3 gleichen oder verschiedenen Halogenatomen, vorzugsweise Fluor oder Chlor, wobei Trifluormethyl und Trifluormethoxy besonders hervorgehoben seien).

Bevorzugt steht einer der Reste  $R^1$  und  $R^2$  für einen aromatischen Rest (vorzugsweise einen gegebenenfalls substituierten Phenylrest).

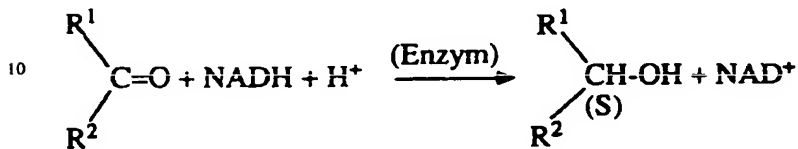
Weiterhin steht vorzugsweise einer der Reste  $R^1$  und  $R^2$  für einen gegebenenfalls substituierten Alkylrest.

Als für das erfindungsgemäße Verfahren ganz besonders vorteilhaft einsetzbare Verbindungen der Formel

(II) seien die gegebenenfalls im Phenylring substituierten Acetophenone hervorgehoben ( $R^1$  steht für gegebenenfalls substituiertes Phenyl und  $R^2$  steht für  $C_1 - C_4$ -Alkyl), wobei das p-Chloracetophenon besonders hervorgehoben werden soll.

Unter (S)-Alkoholen werden Alkohole verstanden, die gemäß der üblichen Nomenklatur nach R.S. Cahn, C. Ingold und V. Prelog in der S-Form vorliegen.

Das erfindungsgemäße Reduktionsverfahren kann durch folgendes Reaktionsschema beschrieben werden:



Wie bereits oben erwähnt wurde, können bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens die Dehydrogenasen in der Form der rohen Enzymzubereitungen (z. B. Rohextrakte aus dem flüssigen oder festen Fermentationsgut; abhängig davon, ob die Enzyme zellulär oder extrazellulär vorliegen) oder in aufgereinigter Form und auch gegebenenfalls in immobilisierter Form eingesetzt werden. Bei zellulär vorliegenden Enzymen (wie bei *Rhodococcus erythropolis*) können auch die Mikroorganismenzellen (vorzugsweise nach deren Abtötung) direkt oder in immobilisierter Form verwendet werden.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt in der für enzymatische Verfahren üblichen Weise.

Die für den jeweiligen Fall günstigsten Verfahrensparameter können durch einfache Vorversuche leicht ermittelt werden.

Vorzugsweise werden die zu reduzierenden unsymmetrischen Ketone in Wasser gelöst, wobei auch übliche Lösungsvermittler (z. B. niedere Alkohole oder Emulgatoren), welche die Enzymaktivitäten und Coenzymaktivitäten in der jeweiligen Konzentration nicht erheblich nachteilig beeinflussen, zugesetzt werden können. Gegebenenfalls kann auch, insbesondere bei schwer wasserlöslichen Ketonen, in zwei Phasen gearbeitet werden, wobei auf eine gute Durchmischung (möglichst guter Kontakt mit dem Enzym und dem Coenzym) zu achten ist.

Die Dehydrogenase-Konzentration kann ebenfalls in einem sehr weiten Bereich variiert werden. Sie ist abhängig von der Verfügbarkeit und spezifischen Aktivitäten der Dehydrogenasen sowie von der Art der Enzymzubereitung und der Reinheit des Enzyms. Vorzugsweise werden Enzymaktivitäten von mehr als 1 m U/mg Protein eingesetzt. Die Enzymkonzentration liegt vorzugsweise bei 0,05 bis 30 U/ml, besonders bevorzugt bei 0,1 bis 20 U/ml und ganz besonders bevorzugt bei 1 bis 10 U/ml. Besonders hervorgehoben seien Konzentrationen von 4 bis 8 U/ml.

Bei dem erfindungsgemäßen Reduktionsverfahren können die Temperaturen weitgehend variiert werden. Das Verfahren wird vorzugsweise bei 30 bis 60°C, besonders bevorzugt bei 35 bis 55°C und ganz besonders bevorzugt bei 40 bis 50°C durchgeführt.

Die pH-Wertebereiche können beim erfindungsgemäßen Reduktionsverfahren über weite Bereiche variiert werden, wobei zur pH-Wert-Einstellung die üblichen Methoden verwendet werden, wie Säuren- (z. B. HCl) oder Basenzugabe (z. B. NaOH) oder durch die Verwendung von Puffersystemen. Man arbeitet vorzugsweise bei pH 5 bis 8,5, besonders bevorzugt bei pH 4,5 bis 8,0 und ganz besonders bevorzugt bei pH 4,8 bis 7,5.

Die Substrat(Keton)-Konzentration kann über weite Bereiche variiert werden. Die zu reduzierenden Ketone liegen im Reaktionssystem vorzugsweise in Konzentrationen von 0,1 bis 20 mMol/l, insbesondere von 1 bis 15 mMol/l, ganz besonders bevorzugt von 3 bis 7 mMol/l und speziell hervorgehoben bei etwa 3,5 mMol/l.

Die Konzentration des Coenzym NADH ist ebenfalls weitgehend variabel. Das Enzym wird in Konzentrationen von vorzugsweise 10 bis 1500  $\mu$ Mol/ml, besonders bevorzugt von 50 bis 500  $\mu$ Mol/ml und ganz besonders bevorzugt von 150 bis 200  $\mu$ Mol/ml eingesetzt. Das Coenzym NADH kann auch mit den bekannten Mitteln, z. B. durch Zugabe von Isopropanol und/oder Formiat und Formiat-Dehydrogenase oder in bekannter Weise elektrochemisch regeneriert werden. Dies ist besonders vorteilhaft, wenn das erfindungsgemäße Reduktionsverfahren kontinuierlich durchgeführt werden soll (z. B. mit Hilfe von immobilisiertem Enzym). Bei der Verwendung ganzer Mikroorganismenzellen können übliche durch diese verwertbare Kohlenstoffquellen, wie Glucose, Fructose, Glycerin und Essigsäure (zur Coenzym-Regenerierung) zugefügt werden.

Wird nach dem erfindungsgemäßen Verfahren z. B. p-Chloracetophenon mit *Rhodococcus erythropolis* (vorzugsweise Stämme 743 und 43 297) zu (S) 1-(p-Chlorphenyl)-ethanol reduziert, lassen sich die folgenden optimalen Reaktionsparameter ermitteln (welche auch zur Charakterisierung des Enzyms herangezogen werden können):

pH = 6,0, Temperatur = 45°C, p-Chloracetophenon-Ausgangskonzentration = 3,5 mMol/ml und NADH-Konzentration = 180  $\mu$ Mol/ml.

Biochemische Verfahrensweisen und Methoden, welche im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahrens angewendet werden können, werden in Bryan Williams and Keith Wilson, Principles and Techniques of Practical Biochemistry, Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, 1975 und entsprechende deutsche Ausgabe Praktische Biochemie Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1978 beschrieben, wo sich auch viele Hinweise auf weitere Literatur findet.

Benutzte Materialien und Warenzeichen:

Tween 80 ist ein Polyoxyethylen-sorbitan.

Tween ist ein Warenzeichen der Firma ICI America Inc., Atlas Chemicals Division, USA.

Brij 58 ist ein Polyoxyethylen-monocetylother.

Brij ist ein Warenzeichen der Firma ICI America Inc., Atlas Chemicals Division, USA.

Triton X-100 ist ein p-t-Octylphenyl-polyethylenglykolether.

Triton ist ein Warenzeichen der Firma Rohm & Haas, USA.

Baylith T 144 ist ein Zeolith.

Baylith ist ein Warenzeichen der Bayer AG, Leverkusen, Bundesrepublik Deutschland.

Die erfindungsgemäß erhältlichen sekundären (S)-Alkohole können als Ausgangs- und Zwischenprodukte sowie als Hilfsmittel für die Synthese organischer Chemikalien, die auch biologische Wirksamkeiten (z. B. pestizide Wirkungen) aufweisen können, verwendet werden.

Als Beispiele für solche Verwendbarkeiten seien aufgeführt:

Synthese von (+) Compactin (Verwendung von chiralem Phenylethanol):

Rosen, T., Heathcock, C.H.

Total synthesis of (+)-Compactin.

J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 3731–3733 Präparation von chiralem R- oder S-Phenylethylbromid aus R- oder S-1-Phenylethanol: Hutchins, R.O. et al. A convenient synthesis of labile optically active secondary alkyl bromides from chiral alcohols. J. Org. Chem. 41, (1976) 1071–1073

Asymmetrische Synthese von  $\beta$ -Hydroxyalkanoic acid unter Verwendung von chiralem Phenylethanol: Kudo, Y. et al. Tetrahedron Lett (1972), 2125

Ausgangsverbindung zur Herstellung von S-1-Phenylethansulfonic acid: Ueno, Y. et al. Chem. Lett. (1984) 2125

Chiraler Hilfsstoff bei der asymmetrischen Oxidation von Iminen zu Oxaziridinen: Bucciarelli, M. et al. J. Chem. Soc. Perkin I, (1980) 2152

Umsetzung von S-1-Phenylethanol zu R-Phenylimidazolylderivaten: EP-A-0 149 976

Bacto Pepton ist ein Eiweißhydrolysat der Difco Laboratories, Detroit, USA.

Das erfindungsgemäße Verfahren soll durch die folgenden Beispiele erläutert werden (wo nichts anderes angegeben ist, entsprechen alle %-Angaben Gew.-%):

#### Beispiel 1

##### Screening-Verfahren nach (S)-Alkohol-Dehydrogenase enthaltenden Mikroorganismen

Die zu untersuchenden Mikroorganismen werden unter Verwendung der üblichen Nährmedien herangezogen. Anschließend wird die abgetrennte Zellmasse z. B. durch Vermahlen mit Glasperlen (z. B. 0,3 mm Durchmesser) aufgeschlossen und der Überstand einer wäßrigen Aufschwemmung als mögliche Enzymquelle (Rohextrakt) eingesetzt (bei extrazellulären Enzymen wird hierzu Fermentationsbrühe verwendet, von der die Mikroorganismus-Zellen abgetrennt werden).

Positive Stämme werden auf die Bildung des gewünschten (S)-Alkohols hin untersucht, indem das in einer enzymatischen Umsetzung gebildete Produkt mittels chiraler Gaschromatographie analysiert wird. Für die Umsetzung wird z. B. folgender Ansatz verwendet: 300  $\mu$ l Rohextrakt; 120  $\mu$ l NADH (je 0,4 mM im Test); 300  $\mu$ l p-Chloracetophenon oder des jeweils zu reduzierenden Ketons (4,0 mM im Test, gelöst in Acetonitril); 150  $\mu$ l  $MgCl_2$  (0,1 mM im Test); 38  $\mu$ l Isopropanol (166 mM im Test); 1972  $\mu$ l  $K_p$ -Puffer (100 mM im Test; pH 7,0). Der Zusatz von Isopropanol dient dabei zur Cofaktor-Regenerierung.

Die Reaktion wird durch Zusatz des Rohextrakts gestartet. Sofort nach dem Start wird eine Probe von 750  $\mu$ l entnommen (Nullwert) und eine weitere Probe nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde, wobei die Reaktion jeweils durch Versetzen mit der gleichen Menge Aceton abgestoppt wird. Anschließend wird die Probe 3 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert und über einen 0,45  $\mu$ m Mikrofilter filtriert. Die so gewonnene klare Lösung wird 1:2 (Volumenteile) mit Chloroform ausgeschüttelt und 8  $\mu$ l der Unterphase analysiert.

Dies geschieht mit Hilfe der chiralen Gas-Chromatographie unter folgenden Trennbedingungen:

Stationäre Phase: Chirale Kapillarsäule auf Basis von Cyclodextrinen (Lipodex E<sup>®</sup>, Warenzeichen der Fa. Machery und Nagel, Düren, Bundesrepublik Deutschland); Mobile Phase: Helium; Injektionsvolumen: 8  $\mu$ l; Detektion: FID; Temperatur: 110°C.

Unter diesen Bedingungen wird z. B. das Edukt p-Chloracetophenon mit einer Retentionszeit von 17,3 Minuten eluiert, das gewünschte Produkt S-p-Chlorphenylethanol bei 39,4 Minuten und das R-Enantiomere bei 37,4 Minuten. Die Zuordnung geschieht in diesem Fall mittels enantiomerenreinem R-p-Chlorphenylethanol, der mit Hilfe des Enzyms aus Lactobacillus kefir hergestellt wurde (Hummel (1990) Biotechnol. Lett. 12, 403–408).

Auf diese Weise wurden auch die oben speziell genannten Mikroorganismus-Stämme als erfindungsgemäß geeignete Stämme aufgefunden.

Die Rohextrakte können wie folgt auf die Enzymaktivität geprüft werden:

Der Rohextrakt wird mittels eines Photometer-Tests auf Enzymaktivität geprüft, dabei wird jeweils mit NADH getestet. Die Testlösung enthält im einzelnen:

960  $\mu$ l  $K_p$ -Puffer 0,1 M pH 7 mit 0,78 mM des zu reduzierenden Ketons, z. B. p-Chloracetophenon,

20  $\mu$ l NADH (12,7 mM) und

20  $\mu$ l Rohextrakt.

Die Aktivität wird photometrisch über die Änderung der NADH-Absorption bei 340 nm ermittelt. Eine Enzymeinheit (U) entspricht dabei der Enzymmenge, die die Abnahme von 1  $\mu$ Mol NADH pro einer Minute katalysiert.

## Beispiel 2

## Gewinnung der (S)-Alkohol-Dehydrogenase

2A) Züchtung von *Rhodococcus erythropolis*

Zur Gewinnung von Zellmasse wird der Stamm *Rhodococcus erythropolis* (743 oder 43297) in folgendem Medium kultiviert (pro 1 l): 4 g Glucose, 4 g Hefeextrakt, 10 g Malzextrakt, 2 g  $\text{CaCO}_3$ , pH 7,2. Sofern erforderlich, werden zum Verfestigen der Nährlösung 12 g Agar zugesetzt.

Nach Wachstum für 3 Tage bei 30°C wird die Zellmasse durch Zentrifugation gewonnen. Zum Aufschluß wird die Zellmasse in Tris-HCl-Puffer (0,1 M; pH 7,0) suspendiert, wobei pro 1 g Zellmasse 2 ml Aufschluß-Puffer verwendet werden. Der Aufschluß wird, wie oben beschreiben, durch Vermahlen mit Glasperlen durchgeführt. Nach Abtrennen der Zellbruchstücke durch Zentrifugation (15 Minuten bei 12000 UpM, 4°C) erhält man einen klaren Überstand, der für die weitere Reinigung und Charakterisierung des Enzyms verwendet wird.

## 2B) Anreicherung des Enzyms

Das Enzym kann durch Ionenaustausch-Chromatographie und Gelfiltration gereinigt werden. Zur Angabe des Reinigungsgrades dient der Anreicherungsfaktor, der die Erhöhung der spezifischen Aktivität (U/mg Protein) angibt. Zur Aktivitätsbestimmung wird ein gegenüber dem Screening leicht veränderter Test verwendet mit folgender Zusammensetzung:

880 µl Kp<sub>i</sub>-Puffer 0,1 M pH 6,0 mit 1,56 mM p-Chloracetophenon

20 µl NADH (12,7 mM; 254 µM im Test)

100 µl Enzymlösung.

Sofern nicht anders angegeben, wird die Messung bei 30°C und 340 nm am Photometer durchgeführt.

## 2B1) Ionenaustausch-Chromatographie

Der Rohextrakt wird 1:2 (Volumenteile) mit dem für die Chromatographie verwendeten Laufpuffer verdünnt und anschließend 4 Minuten bei 13 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird zunächst über 0,45 µm dann über 0,2 µm Mikro-Filter filtriert. Die nun klare Lösung wird auf eine Säule (50 ml Innenvolumen) mit einem Anionenaustauscher aus quervernetzter Agarose mit quartären Ammoniumgruppen (Q-Sepharose-Säule, Warenzeichen der Fa. Pharmacia; Freiburg, Bundesrepublik Deutschland) aufgegeben. Als Laufpuffer wird eine Kaliumphosphat-Lösung (50 mM; pH 7) verwendet. Nach Anwendung von 50 ml des Laufpuffers wird ein NaCl-Gradient (zwischen 0–1 M) für die Elution der gebundenen Proteine verwendet. Bei einer NaCl-Konzentration von ca. 450 mM wird die geeignete Alkohol-Dehydrogenase eluiert. Die erzielte Anreicherung ist in Tab. 1 aufgeführt.

## 2B2) Gelfiltration

Die vereinigten enzymatisch aktiven Fraktionen der Ionenaustausch-Chromatographie werden auf eine Gelfiltrations-Säule mit 10 ml Inhalt gefüllt mit quervernetzter, poröser Agarose für die Gelfiltration, Fraktionierungsbereich für globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht von 1000 bis 300 000 (Superose 12; Warenzeichen der Fa. Pharmacia, Freiburg, Bundesrepublik Deutschland) aufgetragen. Als Puffer wird Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,0) mit 0,15 M NaCl verwendet. Die Chromatographie wird mit einer Flußrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Anreicherung der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis*

Reinigungs-schritt	Protein [mg/ml]	spez. Akt. [U/mg]	AF <sup>1</sup>	Ausbeute (%)
Rohextrakt	4,97	0,12		100
Ionenaustauscher	0,092	4,24	35	83
Gelfiltration	0,029	10,14	84	59

AF<sup>1</sup> = Anreicherungsfaktor

spez. Akt. = spezifische Aktivität

## Beispiel 3

3A) Bestimmung der pH- und Temperaturoptima der Dehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* (743 und



## a) pH-Optimum:

Die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert wird bestimmt, indem p-Chlor-Acetophenon (0,725 mM) in verschiedenen Puffern gelöst wird, die Puffer sind jeweils 0,1 M und haben unterschiedliche pH-Werte (pH 4–5 Zitronensäure; pH 6–8 Kaliumphosphat; pH 9–10 Tris-HCl). Zu 880 µl einer solchen Substratlösung werden 20 µl NADH und 100 µl Enzymlösung (9,2 mg/ml) zugesetzt und die Aktivität bei 340 nm (30°C) gemessen. Der in der Küvette nach Mischung der Einzelkomponenten erreichte End-pH-Wert wird gemessen, er zeigt in keinem Fall eine signifikante Abweichung vom Anfangs-pH-Wert des Puffers. Das Optimum für die p-Chloracetophenon-Reduktion liegt bei pH 6,0.

## b) Temperatur-Optimum:

Zur Bestimmung der optimalen Testtemperatur wird die Enzymaktivität zwischen 26 und 55°C gemessen. Der Testansatz enthält jeweils: 880 µl K<sub>pi</sub>-Puffer 0,1 M pH 6,0 mit 1,56 mM p-Chloracetophenon, 20 µl NADH (12,7 mM) und 100 µl Enzymlösung (9,2 mg/ml).

Die Testansätze werden 10 Minuten bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert, dann wird mit Enzymlösung gestartet und Enzymaktivität bei den verschiedenen Temperaturen gemessen. Man erhält ein Temperatur-optimum für die Aktivität von 45°C.

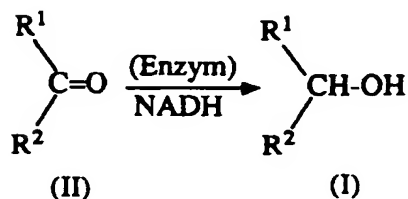
3B) Molekulargewicht der Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis*

Das Molekulargewicht des Enzyms wird mittels Gelfiltration an einer Superose 12-Säule (vgl. oben) bestimmt. Die Säule wird mit Molekulargewichts-Standards von 12 300 Dalton bis 320 000 Dalton in 50 mM K<sub>pi</sub>-Puffer pH 7,5 unter Zugabe von 150 mM NaCl kalibriert. Als Standards werden verwendet: Cytochrom C (12 300), Myoglobin (17 000), Ovalbumin (45 000), Rinderserumalbumin (67 000), Aldolase (160 000) und Aldolase dimer (320 000). Für die Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* ergibt sich ein Molekulargewicht von 72 000 ± 5000 Dalton.

## Beispiel 4

## Reduktion verschiedener Ketone zu (S)-Alkoholen

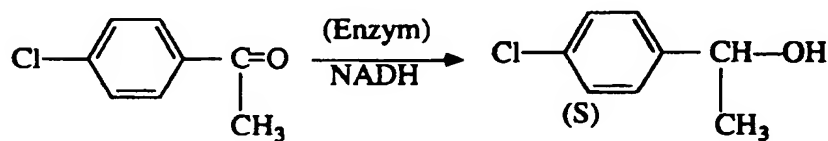
Entsprechend Beispiel 2B) werden mit der Dehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* (743 und 43 297) die folgenden Ketone (Formel (II)) zu den entsprechenden sekundären (S)-Alkoholen (Formel (I)) reduziert, wobei die Enzymkonzentration 9,2 mg/ml beträgt.



Substrat: Verbindung der Formel (II)		Aktivität	
R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	(U/ml)	(%)
o-Chlorphenyl	CH <sub>3</sub>	0,16	12
p-Chlorphenyl	CH <sub>3</sub>	1,33	100
m-Chlorphenyl	CH <sub>3</sub>	3,94	294
p-Bromphenyl	CH <sub>3</sub>	2,62	196
p-Fluorphenyl	CH <sub>3</sub>	0,55	41
p-Methylphenyl	CH <sub>3</sub>	1,63	122
p-Ethylphenyl	CH <sub>3</sub>	2,77	201
p-Methoxyphenyl	CH <sub>3</sub>	0,49	37
Trifluormethoxyphenyl	CH <sub>3</sub>	6,21	463
Phenyl	CH <sub>3</sub>	0,36	27
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	0,14	10
Phenylmethyl	CH <sub>3</sub>	0,75	56

Bezüglich des Cosubstrats ist das Enzym spezifisch für NADH, NADPH wird nicht akzeptiert.

#### Beispiel 5



Eine 1,16 mM Lösung von p-Chloracetophenon wird mit Enzym (6 U/ml) und Coenzym (0,5 mM NADH) umgesetzt (1 ml gesamt), dabei wird das Coenzym NADH durch Kopplung mit Formiat (100 mM) und Formiat-Dehydrogenase (12 U/ml) regeneriert. Zu verschiedenen Zeiten werden Proben entnommen und hierin die Konzentrationen an p-Chloracetophenon und S-p-Chlorphenylethanol mittels chiraler Gas-Chromatographie gemessen (vgl. Beispiel 1).

Zeit (min)	(S)-p-Chlorphenylethanol (mM)
0	0
4	0,07
20	0,94
30	1,00

Das durch diese enzymatische Umsetzung erhaltene Produkt ist enantiomerenrein, unter den oben angegebenen Trennbedingungen mittels chiraler Gaschromatographie ist kein R-Alkohol nachweisbar.

#### Beispiel 6

##### Umsetzung mit ganzen immobilisierten Zellen

Gewaschene Zellen von *Rhodococcus erythropolis* werden mit einer Lösung von gequollenem Alginat versetzt (1 g Bakterien-Feuchtmasse für 3,6 g gequollene Alginat-Lösung). Die Alginat-Lösung wurde hergestellt, indem 0,5 g Alginat-Pulver (Na-Alginat, für die Immobilisierung von Mikroorganismen; Fa. Fluka, Buchs, Schweiz) mit 17,5 ml entionisiertem Wasser versetzt wurden. Bei Erwärmen auf 60°C quoll das Alginat auf, beim Abkühlen auf 42°C werden dann die Zellen zugesetzt. Die Suspension aus Alginat und Zellen wird in eine Spritze gefüllt und durch eine Kanüle in eine Lösung von 2% (Gew.-%) CaCl<sub>2</sub> getropft. Die Tropfen verfestigen sich hier schlagartig, die erhaltenen Perlen können dann als Katalysator für die Umsetzung eingesetzt werden.

Ca. 6 g dieser Perlen werden in eine Säule (15 cm Höhe; 0,8 cm Innendurchmesser) gefüllt, die Perlen werden durch ein feinporiges Sieb zurückgehalten. Die Säule wird kontinuierlich von oben mit Substratlösung beschickt, die Lösung enthält: 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,0; 5 mM Glucose; 2 mM p-Chloracetophenon; 1 mM MgCl<sub>2</sub>;

0,5%  $\text{CaCl}_2$ . Die Substratlösung wird über eine Pumpe mit einer Geschwindigkeit von ca. 5 ml/Std. zugeführt. Von der umgesetzten Lösung werden Stichproben entnommen und der Umsatz und die Enantiomerenreinheit mittels chiraler Gaschromatographie analysiert. Innerhalb von 6 Tagen werden ca. 750 ml (1,5 Mol) Keton eingesetzt, es wird im Mittel ein Umsatz von ca. 90% erreicht. Die chirale Trennung zeigt, daß der Gehalt an R-Alkohol, bezogen auf den S-Alkohol, bei < 1% liegt.

5

#### Beispiel 7

#### Umsetzung mit ganzen immobilisierten Zellen

10

Gewaschene Zellen von *Rhodococcus erythropolis* werden mit Alginat immobilisiert wie in Beispiel 6 beschrieben. Ca. 0,5 g dieser Perlen werden mit 2 ml einer Lösung versetzt, die 2 mM p-Chlor-acetophenon und 5 mM Glucose enthält. Diese Lösung wird mit 2 ml Heptan überschichtet, das 5  $\mu\text{l}$  p-Chlor-acetophenon (entspr. 19,2 mM) enthält. Die Mischung unter leichtem Rühren mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur (ca. 20°C) stehen lassen. Aus der Heptanenthaltenden Oberphase werden nach 0; 2,5 und 8,5 Stunden Proben entnommen und mittels chiraler Gaschromatographie analysiert. In diesen Proben konnten 0; 1,8 und 4,2 mM S—p-Chlorphenylethanol gemessen werden; R-Alkohol konnte nicht nachgewiesen werden.

15

#### Patentansprüche

20

1. Verfahren zur Herstellung von sekundären (S)-Alkoholen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man unsymmetrische Ketone mit Dehydrogenasen mikrobieller Herkunft, welche gegebenenfalls immobilisiert vorliegen, zusammen mit dem Coenzym NADH behandelt und die (S)-Alkohole nach den üblichen Methoden isoliert.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Dehydrogenasen mikrobieller Herkunft verwendet, welche spezifisch in Gegenwart von NADH als Coenzym unsymmetrische Ketone zu sekundären (S)-Alkoholen reduzieren können.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Dehydrogenasen verwendet, die aus den Mikroorganismus-Stämmen *Candida succiphilia*, *Rhodococcus erythropolis* und *Pseudonocardia thermophila* erhältlich sind.
4. Enzyme, welche
  - a) Dehydrogenasen sind,
  - b) mikrobieller Herkunft sind und
  - c) spezifisch in Gegenwart von NADH als Coenzym unsymmetrische Ketone zu sekundären (S)-Alkoholen reduzieren können.
5. Enzyme gemäß Anspruch 4, welche aus den Mikroorganismen-Arten *Candida succiphilia*, *Rhodococcus erythropolis* und *Pseudonocardia thermophila* erhältlich sind.
6. Enzyme gemäß Anspruch 4, welche aus *Rhodococcus erythropolis* erhältlich sind.
7. Enzyme gemäß Anspruch 4, welche aus den *Rhodococcus erythropolis* Stämmen 743 und 43 297 erhältlich sind.
8. Verwendung der Enzyme gemäß Anspruch 4, zur Herstellung von sekundären (S)-Alkoholen aus unsymmetrischen Ketonen.

30

35

40

45

50

55

60

65